

PAT-NO: JP358141798A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 58141798 A
TITLE: ANALYSIS OF POLYAMINE
PUBN-DATE: August 23, 1983

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
OKADA, MASATO	
YOSHIMURA, YOSHINORI	

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
TOKUYAMA SODA CO LTD	N/A

APPL-NO: JP57022699

APPL-DATE: February 17, 1982

INT-CL (IPC): C12Q001/26 , C08G073/02 , C12N009/02 , C12R001/265

US-CL-CURRENT: 435/25, 435/189, 435/858

ABSTRACT:

PURPOSE: To determine a polyamine, in high reproducibility, by using a putrescine oxidase derived from *Micrococcus flavidus* as an enzyme and trichloroacetic acid as a desorbing agent.

CONSTITUTION: A polyamine such as spermidine, putrescine, etc. is adsorbed to an adsorbent, preferably a carboxylic acid-type weakly acidic anion exchange resin, and desorbed by using trichloroacetic acid as the desorbing resin, and desorbed by using trichloroacetic acid as the desorbing agent. The resultant polyamine solution is made to react with a putrescine oxidase derived from *Micrococcus flavidus* preferably at 7.0. 8.5pH and 10. 40°C. The produced hydrogen peroxide is determined by colorimetry using a proper reagent.

COPYRIGHT: (C)1983,JPO&Japio

⑯ 日本国特許庁 (JP)
⑰ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭58-141798

⑩ Int. Cl.³
C 12 Q 1/26
C 08 G 73/02
// C 12 N 9/02
C 12 R 1/265

識別記号
8213-4B
7445-4J
7236-4B
6760-4B

④ 公開 昭和58年(1983)8月23日
発明の数 1
審査請求 未請求

(全 8 頁)

⑤ ポリアミンの分析法

⑥ 特 願 昭57-22699
⑦ 出 願 昭57(1982)2月17日
⑧ 発明者 岡田昌人
徳山市御影町1番1号徳山曹達

株式会社内

⑨ 発明者 吉村佳典
徳山市御影町1番1号徳山曹達
株式会社内
⑩ 出願人 徳山曹達株式会社
徳山市御影町1番1号

明細書

1. 発明の名称 ポリアミンの分析法

2. 特許請求の範囲

(1) ポリアミンを吸着させた脱着体から脱着剤を用いてポリアミンを脱着し、得られたポリアミン溶液に酵素を作用させて生じる過酸化水素を検出して行なうポリアミンの分析法において、脱着剤としてトリクロロ酢酸を用い、且つ酵素としてミクロコツカス・フラビダス系のアトレン・オキシダーゼを用いることを特徴とするポリアミンの分析法。

(2) ポリアミンがスペルミジンである特許請求の範囲第(1)項記載の分析法。

(3) 脱着体が陽イオン交換樹脂である特許請求の範囲第(1)項記載の分析法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はポリアミンの分析法就中尿中ポリアミンの分析法に関する。ポリアミンは、生物界に広く分布しているが、増殖の著しい細胞中に含量が高く、特に腫瘍細胞中の含量が高いことから医

学上で重要視されている。また、癌患者の体液例えれば血液、尿等の中のポリアミン含量は健康人に比べて高いことが、1975年ラツセル等により示された。それ以後、癌と体液中のポリアミンの濃度との相関性が多くの研究者によつて調べられ、ラツセル等の研究結果の妥当性が確かめられている。

しかし乍ら、体液中のポリアミンの定量は、その濃度が低いこととポリアミン以外の種々の夾雜物が含まれていることから非常に困難である。

現在、最も信頼性の高いポリアミン定量法は、高速液体クロマトグラフを使用する方法である。しかし、この方法を使つた分析所要時間は一検体について、一時間以上であるために、研究レベルまでの分析法としての域を脱していない。

一方、体液中のポリアミン濃度を迅速に分析することを目的として酵素法が注目されている。酵素法によるポリアミン定量分析の原理は、ポリアミン分解酵素を用いてポリアミンより検出容易な生成物を得て、その生成物を検出するものである。

しかし、酵素法によるポリアミン定量においてポリアミン分解酵素として何を選択するかが問題となる。その一つとして、アトレシン・オキシダーゼが挙げられる。アトレシン・オキシダーゼなる酵素は、足立等により、ミクロコツカス・ローゼウス中に見出されている〔アグリカルチャラル・イオロジカル・ケミストリー・30巻、1202(1966)〕。しかし、上記ミクロコツカス・ローゼウスから得られる酵素を酵素法によるポリアミン定量に適用する場合、次の欠点を有する。即ち、(1)ミクロコツカス・ローゼウスは菌体内に蓄積するアトレシン・オキシダーゼの量が少なく、酵素の調製が煩雑である。(2)ミクロコツカス・ローゼウスの細胞壁は非常に強固であり、菌体内からアトレシン・オキシダーゼを抽出する際、特殊な機器を使って菌体を破砕し酵素を抽出しなければならない。(3)ミクロコツカス・ローゼウスから得られるアトレシン・オキシダーゼのアトレシンに対するミカエリス定数 K_m 値が比較的大きい(1.2×10^{-4} M)のため、非常に微量のポリ

アミン($10^{-7} \sim 10^{-8}$ M)を定量する場合に酵素反応速度が遅くなり、従つて定量時間が長くなるという欠点がある。

本発明者等は、上記3点の欠点すなわちアトレシン・オキシダーゼの収率が低いこと、菌体の破碎が困難であること、及びアトレシンに対するミカエリス定数 K_m 値が大きいことを解決するために、各種微生物中のアトレシン・オキシダーゼの検索を行い、ミクロコツカス・ローゼウス系のものに比較して、酵素生産性が30倍以上高く、菌体内の酵素比活性が8倍以上高く、さらに細胞破碎が容易なために酵素精製が容易であり、酵素回収量が多いアトレシン・オキシダーゼの製造方法を発明し、先に提案した(特願昭55-92792号、特開昭57-号)。

本発明は、上記の製造方法により得られるミクロコツカス・フラビダス系のアトレシン・オキシダーゼを用いるポリアミンの分析法である。

一般に、酵素法によるポリアミン定量分析は、例えば尿中のポリアミンを適当な吸着体に吸着さ

せた後、脱脂剤を用いてポリアミンを脱脂し、得られたポリアミン溶液に酵素を作用させて生じる過酸化水素を比色定量して行なわれる。然るに、酵素として、ミクロコツカス・フラビダス系のアトレシン・オキシダーゼを用いた場合、脱脂剤として従来使用されている塩酸、硫酸などの酸溶液あるいは食塩を代表とする塩類を含有する水溶液を用いると、スペルミジンなどポリアミンの種類によつては、比色定量における発色強度が不安定で、且つ再現性がないという欠点があることが判明した。

本発明は、かかる課題を解決すべくなされたものである。

即ち、本発明は、ポリアミンを吸着させた吸着体から脱脂剤を用いてポリアミンを脱脂し、得られたポリアミン溶液に酵素を作用させて生じる過酸化水素を検出して行なうポリアミンの分析法において、脱脂剤として、トリクロロ酢酸を用い、且つ酵素としてミクロコツカス・フラビダス系のアトレシン・オキシダーゼを用いることを特徴と

するポリアミンの分析法である。

ポリアミンとしては、スペルミジン、アトレシン、スペルミンなどが挙げられるが、本発明を用いて特に有効なのは、スペルミジンであつて、以下、スペルミジンをポリアミンの代表として説明する。

スペルミジン例えは尿中スペルミジンに酵素を作用させて生成する過酸化水素を、比色定量する際には、発色の妨害物質を除去する目的で、スペルミジンを含有する尿を適当な吸着体に接触させてスペルミジンを吸着させ、発色妨害物質を分離除去した後に、脱脂剤により、発色妨害物質を含まないスペルミジン溶液を得て行なり。

吸着体としては、特に限定されず、陽イオン交換樹脂、セルロースイオン交換体その他が挙げられるが、好ましくは、陽イオン交換樹脂が用いられる。陽イオン交換樹脂としては、通常の各種陽イオン交換樹脂が用いられるが、比較的温和な条件でスペルミジンを吸着させることができるという理由で、カルボン酸型の弱酸性陽イオン交換樹

脂が特に好ましく用いられる。また、尿試料としては、採尿されたままの未処理尿でもよいが、例えば、アシルポリアミン・アミドヒドロラーゼ（特開昭56-144088）を用いて加水分解処理した尿を用いてもよい。

本発明の最大の特徴は、酵素としてミクロコッカス・フラビダス系のアトレシン・オキシダーゼを用いることと共に、脱着剤としてトリクロロ酢酸を用いることである。トリクロロ酢酸は、通常の市販品あるいは生化学用特級のものなどが任意に用いられ、その濃度としては、通常0.1～1.0Nであるが、特に0.2～0.5Nのものが好ましく用いられる。トリクロロ酢酸の使用量は、通常吸着体／容に対して2～30容の範囲である。また、トリクロロ酢酸を用いて、脱着する方法は、従来の塩酸、硫酸などを用いる場合と同様に、ポリアミンを脱着させた吸着体をカラム等に充填し、脱着剤をカラム上部から供給して行うとよい。トリクロロ酢酸を用いて脱着して得られたスペルミジン溶液にミクロコッカス・フラビダ

ス系のアトレシン・オキシダーゼを作用させる。ミクロコッカス・フラビダス系のアトレシン・オキシダーゼとは、ミクロコッカス・フラビダスの培養物から得られるアトレシン・オキシダーゼであつて、その製造方法の概略は後述するが、その詳細は、前記したように本発明者等が先に提案し、特開昭57-18984号として公知である。ミクロコッカス・フラビダス（Micrococcus Flavidus）は、上記の特開昭57-18984号に記載されるように、本発明者等が見出したミクロコッカス属に属する新種と認められるものであつて、新しく命名し、微生物保管委託申請書受理番号5633として工業技術院微生物工業技術研究所に寄託しているものである。

トリクロロ酢酸を用いて脱着して得られたスペルミジン溶液にミクロコッカス・フラビダス系のアトレシン・オキシダーゼの酵素を作用させる際通常は、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン溶液などのアルカリ溶液でスペルミジン溶液を中和して後に、該酵素を作用させるとよい。

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン溶液の濃度としては、一般に、0.2～2.0モル濃度のものが好ましく用いられる。

また、スペルミジン溶液にミクロコッカス・フラビダス系のアトレシン・オキシダーゼを作用させる際の反応条件は、特に限定されないが、反応液のpHが7.0～8.5特に7.5～8.0であることが反応速度が速いという点で好ましい。その他の条件としては温度が1.0～4.0℃特に2.0～3.5℃の条件を満足するようにして行う方が好ましい。トリクロロ酢酸を用いて脱着して得られたスペルミジン溶液にミクロコッカス・フラビダス系のアトレシン・オキシダーゼを作用させると、スペルミジン溶液中に含まれるスペルミジンの量即ち、尿中に含まれていたスペルミジンの量に応じて、過酸化水素が生成する。この過酸化水素を適当な試薬で比色定量すればよい。試薬としては、通常、4-アミノアンチビリン/ジクロルフェノール/ペルオキシダーゼ系のものが好ましく使用される。

本発明の効果上の最大の特徴は、比色定量において、発色強度が安定化し、且つ再現性が得られることである。即ち、ミクロコッカス・フラビダス系のアトレシン・オキシダーゼは、前記したように、酵素生産性、酵素比活性及び細胞破碎の点で有利であるが、これを用いた場合、脱着剤として、従来使用されている塩酸、硫酸などの酸溶液あるいは食塩などの塩類水溶液を用いると発色強度が不安定で、再現性がなく、比色定量により、尿中に含まれるスペルミジンの量を分析することは、実際上、不可能である。然るに、脱着剤として、トリクロロ酢酸を用いた場合は、尿中に含まれるスペルミジンの量に比例した発色強度が常に得られるものである。ミクロコッカス・フラビダス系のアトレシン・オキシダーゼを用いた場合のこのような特異な現象は、全く意外である。このような特異な現象がみられる理由は、明らかでないが、本発明者等は、一応次のように推測している。すなわちミクロコッカス・フラビダス系のアトレシン・オキシダーゼは、通常の条件下ではス

ペルミシンの2級アミノ基のみを酸化するのではなく、末端の1級アミノ基も酸化するが、トリクロロ酢酸存在下では、スペルミシンの2級アミノ基のみを選択的に酸化し、スペルミシン/当量に對して安定に1当量の過酸化水素を発生させるものと推定している。

また、本発明で用いるミクロコツカス・フラビダスの生物学的性質は、以下に示す通りである。尚、色の表示は『色の標準』(日本色彩社発行、1951年版)に従つた。

(1) 形態

培地として肉汁および肉汁寒天培地を使用した。

① 細胞の形および大きさ

球形。培養初期から中期にかけて二連球となる。0.5~0.9 μm(直径)

② 細胞の多形性

なし

③ 運動性

なし(鞭毛なし)

アルカリ性、ミルクの凝固と凝固はともになし。

(2) 生理学的性質

① 硝酸塩の還元

陽性

② 脱硫反応

陰性

③ M R テスト

陰性

④ V P テスト

陰性

⑤ インドールの生成

陰性

⑥ 優化水素の生成

陰性

⑦ デンプンの加水分解

陰性

⑧ クエン酸の利用

陽性

⑨ 無機窒素源の利用

陽性

⑩ 色素の生成

陰性

⑪ ウレアーゼの生成

陽性

⑫ オキシダーゼ

陰性

⑬ カタラーゼ

陽性

⑭ 生育の範囲

pH 5.0~10.0

温度 20~38°C

由 線糸に対する態度

好気性

⑮ 胞子

なし

⑯ グラム染色性

陽性

⑰ 抗酸性染色

陰性

(2) 各培地における生育状態

⑱ 肉汁寒天平板培養

生育良好、円形、凸状、不透明、にぶ色(dull yellow)、可溶性色素の生成なし。

⑲ 肉汁寒天斜面培養

生育良好、線状に生育、不透明、にぶ黄(dull yellow)、可溶性色素の生成なし。

⑳ 肉汁液体培養

生育良好、均一に混濁、菌膜の形成なし、沈殿の生成なし、セグメントの生成なし。

㉑ 肉汁ゼラチン穿刺培養

表面に生育、生育中程度、ゼラチンの液化なし。

㉒ リトマス・ミルク培養

㉓ O-F テスト (Hugh Leifson 法)

糖を分解しない

㉔ 糖類からの酸の生成

L-アラビノス	陰性	トレハロース	陰性
D-キシロース	陰性	D-ソルビット	陰性
D-グルコース	陰性	D-マンニト	陰性
D-マンノース	陰性	イノシット	陰性
D-フラクトース	陰性	グリセリン	陽性
D-ガラクトース	陰性	乳糖	陰性
麦芽糖	陰性	デンプン	陰性
ショ糖	陰性		

すべての糖類についてガスの発生は観察されず

また、ミクロコツカス・フラビダスから、トレシン・オキシダーゼを得るには以下のようになります。

まず上記の微生物をトレシンを含有する培地下、酵素などを生産する通常の方法で培養する。培養の形態は液体通気培養が有利である。培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用される。炭素源としては同化可能

な炭化水素であれば良く、例えばグルコース、糖蜜、グリセリンなどが使用される。窒素源としては、利用可能な窒素化合物であれば良く、例えばペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーン、ステイービー、リカーア、硫酸、塩安などが使用される。その他、食塩、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウムなどの塩類が必要に応じて使用される。

また、培地中にアトレスンあるいはスペルミジンを添加せしめて、培養時アトレスン・オキシダーゼの生産能を上昇せしめることが好ましい。添加するアトレスンとスペルミジンを比較した場合、仙格とアトレスン・オキシダーゼの生産能の上昇効果の点からアトレスンの方が有利である。アトレスンあるいはスペルミジンの添加量としては0.05~1.0%の範囲で、好ましくは0.1~0.5%程度添加される。培養温度は菌が発育しアトレスン・オキシダーゼを生産する範囲内でも良いが、好ましくは25~35℃である。培養時間は条件によって多少異なるが、通常5~30時

間程度であつて、菌の生育が定常相(stationary phase)に達した時に培養を終了すればアトレスン・オキシダーゼ生産が最高に達する。かくして得られた培養物中においてアトレスン・オキシダーゼはその菌体内に含有、蓄積される。

この様にして得られた培養物中よりアトレスン・オキシダーゼを抽出し、粗製のアトレスン・オキシダーゼ含有液を得るためにには、例示すれば、まず培養物を遠心分離等の手段で固液分離し、得られる湿菌体を必要に応じてリン酸緩衝液やトリス-塩酸緩衝液などに懸濁せしめ、次いで超音波破碎処理やダイノミルによる破碎処理リソチーム処理などの菌体処理手段を適宜選択組合せて、菌体内よりアトレスン・オキシダーゼを抽出し、粗製のアトレスン・オキシダーゼ含有液を得る。

さらにこの粗製アトレスン・オキシダーゼ含有液を公知の蛋白質、酵素などの単離、精製手段を使用して処理することにより精製されたアトレスン・オキシダーゼを得ることが出来る。

次に、実施例及び比較例を挙げるが、本発明は、これらに限定されるものではない。

実施例-1

尿100mlを採取し、1Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)を用いてpHを7.8に調整した後、3,000rpmで10分間の遠心分離により沈殿物を除去した上清に、最終濃度が20 mMとなるようスペルミジン水溶液を添加した。

このようにして調製した尿試料溶液8mlを陽イオン交換樹脂バイオレツク70(バイオ・ラド社製、カルボン酸型)のミニカラム(樹脂量0.2ml)に通過させた。

イオン交換水5.0mlでミニカラムを洗浄後、0.2Nトリクロロ酢酸で溶出し、溶出液3.0mlを得た。

溶出液中のスペルミジンをミクロコツカス・フラビダスより精製したアトレスン・オキシダーゼを用いて酵素的定量を行つた。検出はアトレスン・オキシダーゼがスペルミジンに作用して生成する過酸化水素を4-アミノアンチビリン/ジクロルフェノール/ペルオキシダーゼ系で発色せしめるこことにより行つた。

アツセイ液

0.1Mトリス塩酸緩衝液	100ml
含 4-アミノアンチビリン	12mg
ジクロルフェノール	4.8mg
ペルオキシダーゼ	4mg
アトレスン・オキシダーゼ	100units

溶出液1.0mlIC0.5Mトリス溶液0.15mlを加えて中和した後、上記アツセイ液1.0mlを加えて30℃で反応させ、514 nm の吸光度OD₅₁₄を測定した。その結果、第1表に示すように反応開始後約30分で一定の吸光度を示すようになり、その値は60分後でも変化せず安定であった。

また、第1-1図に吸光度の経時変化の様子を示す。

比較例-1

実施例-1に示した中で0.2Nトリクロロ酢酸を0.2N塩酸に代えた以外は実施例に示したと同一の操作を行ない、514nmの吸光度： OD_{514} を測定したところ、第2表に示すように OD_{514} は一定値を示さず吸光度は反応開始後60分でも増加し続けていた。

第1表

反応時間(分)	5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60											
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
OD_{514}	0.112	0.201	0.249	0.276	0.292	0.294	0.294	0.294	0.294	0.294	0.294	0.294

第2表

反応時間(分)	5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60											
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
OD_{514}	0.118	0.210	0.261	0.290	0.308	0.321	0.340	0.355				

また、吸光度の経時変化の様子を第1-1図に示す。

実施例-2

実施例-1に示した中で最終スペルミジン濃度を0、10、20、30、40及び50μMと変化させた以外は実施例-1に示したものと同一の操作を行なつて、30分後の514nmの吸光度： OD_{514} を測定した結果は第3表の通りであつた。

スペルミジン濃度の場合の吸光度 0.022 を
プランク値として、スペルミジン濃度; C (mM)
と OD_{514} との関係式を求めた結果式のようにな
つた。

$$C = \frac{OD_{514} - 0.022}{0.01356} \quad (\mu M) \quad (II)$$

実施例-3

実施例-1に示した中で、添加するスペルミジン濃度を未知濃度とした以外は実施例-1に示したものと同一の操作を行なつて、30分毎の 514 nm の吸光度; OD_{514} を求め、実施例-2で求めた式の校正線を用いて尿中スペルミジンの定量を行なつた。

また、同時に、トリクロロ酢酸によつて脱着されたスペルミジン溶液を高速液体クロマトグラフイー(HPLC)で分析することにより、尿中スペルミジン濃度を求めた。

これら両者の分析結果を第4表に示した。

第3表

スペルミジン濃度 (μM)	0	10	20	30	40	50
OD ₅₁₄	0.022	0.161	0.294	0.424	0.566	0.700

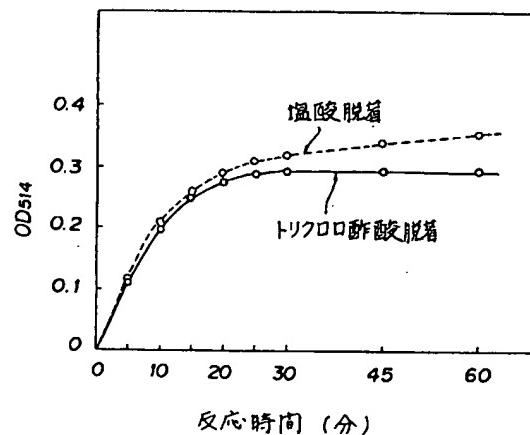
第4表

OD ₅₁₄	OD ₅₁₄ よりの計算値 (μM)	HPLC分析値 (μM)
0.178	11.5	11.3
0.195	12.8	13.3
0.314	21.5	21.0
0.408	28.5	28.8
0.563	39.9	40.3

4. 図面の図章を説明

第1図は、脱着剤として 0.2N トリクロロ酢酸及び 0.2N 塩酸を使用した場合の显色安定性を比較したものである。

第1図



手続補正書

昭和57年6月之夕日

特許庁長官 若杉和夫 殿

1. 事件の表示

昭和57年特許願第22699号

2. 発明の名称

ポリアミンの分析法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 山口県徳山市御影町1番1号

名 称 (318)徳山曹達株式会社

代表者 福田克己

連絡先 東京都港区西新橋1の4の5

徳山曹達株式会社東京本部特許情報部

電話 591-9361

4. 補正命令の日付 自発

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」及び「図面の簡単な説明」の欄

△

を「処理リゾーム」に補正する。

① 同第17頁8行目の「バイオレック70」
を「バイオレックス70」に補正する。

② 同第17頁12行目の「0.2N」を「0.2
M」に補正する。

③ 同第17頁16行目の「ブレトシン」を「
ブトレシン」に補正する。

④ 同第20頁4行目の「0.2N」を「0.2M」
に補正する。

⑤ 同第24頁2行目の「mM」を「μM」に
補正する。

⑥ 同第25頁10行目の「0.2N」を「0.2
M」に補正する。

以上

特開昭58-141798(8)

6. 補正の内容

(1) 明細書第2頁3行目の「1975年」を「
1971年」に補正する。

(2) 同第3頁の3行目と4行目の「ブトレミン
」を「ブトレシン」に補正する。

(3) 同第3頁7行目の「イオロジカル」を「バ
イオロジカル」に補正する。

(4) 同第4頁9行目の「校算」を「検索」に補
正する。

(5) 同第4頁15行目の「母」を「18984
号」に補正する。

(6) 同第7頁12行目の「1.0Nであるが、特
に0.2～0.5N」を「1.0Mであるが、特に
0.2～0.5M」に補正する。

(7) 同第10頁15行目の「ブトレシン」を「
ブトレシン」に補正する。

(8) 同第15頁4～5行目の「コーン・スティ
ーピ・リカ」を「コーン・スティーブ・リ
カ」に補正する。

(9) 同第16頁12行目の「処理リゾーム」